



(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12P 21/08, C12N 5/20 G01N 33/574, 33/577 // C12N 15/06 C12N 15/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/21766 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Dezember 1992 (10.12.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01117 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Mai 1992 (20.05.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 17 090.3 25. Mai 1991 (25.05.91) DE P 42 05 148.7 20. Februar 1992 (20.02.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstr. 10, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BARTKE, Ilse [DE/DE]; Von-Hillern-Weg 2, D-8132 Tutzing (DE). KOSTKA, Günter [DE/DE]; Barerstr. 74, D-8000 München 40 (DE). NAUJOKS, Kurt [DE/DE]; Buchenstr. 3, D-8122 Penzberg (DE). ULLRICH, Axel [DE/DE]; Adalbertstraße, D-8000 München 40 (DE).		(74) Anwälte: WEBER, Manfred usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST C-KIT (54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN C-KIT (57) Abstract <p>The invention concerns monoclonal antibodies against the human c-kit receptor which are obtainable from the DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 and DSM ACC 2009 cell lines or can be bound to the c-kit receptor in a way which is equivalent to the antibodies produced by the DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 or DSM ACC 2009 cell lines. The invention also concerns a method of demonstrating the malignancy of tumours of haematopoietic cells, seminomas or small-cell lung carcinomas. In this method, a tissue sample is incubated with at least one monoclonal antibody against the c-kit receptor as proposed by the invention, the presence of bound antibodies subsequently being demonstrated by prior art methods.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, die aus den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 und DSM ACC 2009 erhältlich sind oder in äquivalenter Weise an den c-kit-Rezeptor bindenfähig sind, wie die von den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 oder DSM ACC 2009 produzierten Antikörper. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis der Malignität von Tumoren der hämatopoietischen Zellen, von Seminomen oder kleinzelligem Lungenkarzinom, bei dem man eine Gewebeprobe mit mindestens einem erfindungsgemäßen, monoklonalen Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor inkubiert und anschließend gebundene Antikörper mittels bekannter Methoden nachweist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Monoklonale Antikörper gegen c-kit

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor sowie ein Verfahren zum Nachweis der Malignität von Tumoren der hämatopoietischen Zellen, von Seminomen oder kleinzelligem Lungenkarzinom über den Nachweis einer veränderten Expression des c-kit-Rezeptors.

Entwicklung, Differenzierung und Stoffwechselfunktionen der Zellen eines mehrzelligen Organismus werden durch Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert. Der erste Schritt ist in vielen Fällen die Bindung dieser Faktoren an einen Rezeptor an der Zelloberfläche. Diese Bindung löst bei einer Reihe dieser Rezeptoren die Phosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Zellproteine aus. Für diese Rezeptor-Tyrosinkinasen konnte ein entscheidender Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Zellen nachgewiesen werden (Yarden und Ullrich, Ann. Rev. Biochem. 57 (1988), 443 - 478). Autokrine Regelsysteme unter Beteiligung von Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Transformation von Zelllinien, die als Tumor-Modellsystem dienen, sowie auch in primärem Tumorgewebe. Für bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. den EGF-Rezeptor und den her2/neu-Rezeptor, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Überexpression des Rezeptors und der Aggressivität des Tumorgeschehens bewiesen werden (Slamon et.al., Science 244, 1989, 707 - 712; Di Fiore et.al., Cell 51, 1987, 1063 - 1070).

Ein weiteres Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinasen-Familie ist c-kit, das als zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-kit (felines Leukämie-Virus FZ4-FesV) entdeckt, kloniert und sequenziert wurde (Yarden et.al. EMBO-Journal 6 (1987), 3341 -

3351). Es weist eine weitgehende Homologie mit dem PDGF-Rezeptor und dem CSF-1-Rezeptor (c-fms) auf. Untersuchungen mit Hilfe der Northern-Blot-Technik weisen auf eine charakteristische Verteilung des Rezeptors in den unterschiedlichen Geweben hin. Eine hohe Expression des c-kit-Gens konnte in hämatopoietischen Zellen und vor allem in Hirngeweben, Melanoblasten, Ovarien und in Stammzellen der Testis nachgewiesen werden (Orr-Urtreger et.al., Development 109 (1990), 911 - 923). Untersuchungen an verschiedenen erythroiden und myeloiden Zelllinien weisen auf eine Expression des c-kit-Gens in frühen Differenzierungsstufen hin (André et.al., Oncogene 4 (1989), 1047 - 1049). Bestimmte Tumoren, wie z.B. Glioblastomazellen zeigen ebenfalls eine deutliche Expression des c-kit-Gens.

Als natürlicher Ligand des c-kit Rezeptors wurde inzwischen ein etwa 30kD großes Protein aus dem Kulturüberstand von murinen Fibroblasten isoliert und als MGF = mast cell growth-factor (Williams et.al., Cell 63 (1990), 167 - 174) oder hämatopoietischer Wachstumsfaktor KL (Huang et.al., Cell 63, (1990), 225 - 233) bezeichnet. Ein entsprechendes Protein wurde auch aus Rattenleberzellen isoliert und SCF = stem cell factor genannt (Zsebo et.al., Cell 63 (1990), 195 - 201). Der entsprechende humane Faktor wurde von Martin et al. kloniert und wird synonym als SCF, MGF oder Steel Factor (SF) bezeichnet (Cell 63 (1990), 203-211).

Die Expression des c-kit-Gens wurde bislang nur auf der Ebene der Transkription über den Nachweis der c-kit-mRNA, insbesondere mit Hilfe der Northern-Blot-Technik bestimmt. Dieses Verfahren kann jedoch nur indirekt Hinweise auf die Menge des exprimierten Proteins geben, da z.B. Regulationsvorgänge auf Translationsebene oder die Stabilität des gebildeten c-kit-Rezeptor-Proteins hierbei überhaupt nicht erfaßt werden. Für die Diagnostik ist es daher von entscheidender Bedeutung, di-

3

rekt die Menge des exprimierten Proteins zu bestimmen. Dies ist mit der erforderlichen Spezifität der Aussage nur mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor möglich.

Von N. Lerner et.al. (Blood 77 (1991), 1876-1883) wurde gezeigt, daß der monoklonale Antikörper YB5.B8 von Gadd et.al. (Leuk.Res. 9 (1985), 1329), der gegen leukämische Blasten eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gerichtet ist, wahrscheinlich mit dem c-kit Protein reagiert. Ein monoklonaler Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor kann jedoch mit eindeutiger Sicherheit nur durch Immunisierung mit einem definierten c-kit Antigen erhalten werden.

Es war daher die Aufgabe der Erfindung, monoklonale Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor sowie ein Verfahren zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen, sowie ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das es ermöglicht, mit Hilfe dieser Antikörper eine veränderte Expression dieses c-kit-Rezeptors nachzuweisen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch monoklonale Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, die aus den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 oder DSM ACC 2009 erhältlich sind oder in äquivalenter Weise an den c-kit-Rezeptor bindefähig sind, wie die von den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 oder DSM ACC 2009 produzierten Antikörper.

Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähiger Antikörper" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem definierten, bekannten Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems leicht nachgewiesen werden. Dazu wird zum Beispiel mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays überprüft, inwieweit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definiertes Antigen bzw. ein spezielles

4

Epitop konkurriert. Dazu inkubiert man das entsprechende Antigen mit dem bekannten monoklonalen Antikörper in markierter Form und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Immobilisierung der gebildeten Komplexe, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Nachweis der gebundenen Markierung in einer der beiden Phasen kann dann leicht festgestellt werden, inwieweit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper aus der Bindung verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50 % bei 10^5 -fachem Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die erhaltenen Antikörper spezifisch nur mit Seminomen (DSM ACC 2008) bzw. Seminomen und kleinzelligem Lungenkarzinom (DSM ACC 2007 und DSM ACC 2009) reagieren, nicht aber mit gesundem Lungengewebe.

Es hat sich weiterhin überraschenderweise gezeigt, daß der monoklonale Antikörper DSM ACC 2007 die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch den Stammzellfaktor SCF inhibiert. Dieser Antikörper hemmt zudem auch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie SCF an den c-kit-Rezeptor und damit auch die SCF-induzierte Phosphorylierung des c-kit-Rezeptors, sowie die SCF induzierte Abnahme der Expression von c-kit-Rezeptormolekülen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor inhibiert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Anti-

körpers auf die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibiert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.

Die Immunisierung wird in den hierfür üblicherweise verwendeten Tieren, wie z.B. Mäusen oder Ratten durchgeführt. Vorzugsweise werden Mäuse verwendet.

Als Immunogen werden vorzugsweise NIH-3T3 Zellen verwendet, die mit einer für das c-kit Protein codierenden cDNA transfiziert wurden. Die Klonierung dieser cDNA wurde wie von Yarden et. al., (EMBO J. 6 (1987), 3341 - 3351) beschrieben, durchgeführt. Die für die Immunisierung verwendete transfizierte NIH-3T3 Zelllinie c-kit wurde am 23.05.1991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2006 hinterlegt.

6

Die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgt vorzugsweise durch Fusionierung mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) gemäß der Methode nach J.of.Imm. Meth. 39 (1980) 285 - 308. Daneben können aber auch andere, dem Fachmann geläufige Verfahren zur Immortalisierung der Milzzellen (z.B. EBV-Transformation) verwendet werden.

Zur Klonierung werden die Zellen z.B. mittels eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters vereinzelt. Zum Nachweis von immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper gegen c-kit produzieren, wird eine Probe des Kulturüberstandes in einem ELISA-Test auf Reaktivität mit dem c-kit-Rezeptor getestet. Um solche Antikörper zu erhalten, welche die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor bzw. die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibieren, wird der Kulturüberstand derjenigen Klone, die an den c-kit-Rezeptor bindende Antikörper produzieren, zusätzlich auf die Hemmung der Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor bzw. die Hemmung der SCF stimulierten Proliferation lymphoider Zellen untersucht.

Die Hemmung der Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor ergibt sich in üblicher Weise durch Inkubation eines markierten Wachstumsfaktors mit dem c-kit-Rezeptor in Gegenwart des zu untersuchenden Antikörpers und anschließender Bestimmung von Rezeptor-gebundenem Wachstumsfaktor.

Die Hemmung der SCF induzierten Proliferation lymphoider Zellen wird in üblicher Weise bestimmt, vorzugsweise über die Fluoreszenzmarkierung von Lymphozyten, deren Proliferation mit SCF stimuliert wurde.

Diejenigen Klone, deren Kulturüberstand eine positive Reaktion ergibt, werden expandiert und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

7

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß der Antikörper DSM ACC 2007 an den mit Paraffin behandelten c-kit-Rezeptor ebenso bindet wie an den nicht mit Paraffin behandelten c-kit-Rezeptor.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden solche Hybridomzellen kloniert, deren Kulturüberstand solche Antikörper enthält, die auch mit dem paraffin-behandelten c-kit-Rezeptor reagieren und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

Der Nachweis von immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper gegen c-kit produzieren, erfolgt bei dieser bevorzugten Ausführungsform über die Inkubation einer Probe des Kulturüberstandes mit einem paraffin-behandelten Gewebeschnitt und Nachweis des an den in diesem Gewebeschnitt enthaltenen c-kit-Rezeptor gebundenen Antikörpers.

Der monoklonale Antikörper DSM ACC 2009 fördert überraschenderweise synergistisch die durch den Stammzellfaktor SCF induzierte Proliferation lymphoider Zellen. Er stimuliert zudem die SCF induzierte Phosphorylierung des c-kit-Rezeptors und bewirkt eine geringe Verzögerung der SCF induzierten Abnahme der c-kit-Rezeptor Expression.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die SCF induzierte Proliferation lymphoider Zellen stimuliert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Anti-

8
körpern auf die Proliferation lymphoider Zellen, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine stimulierende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.

Die Stimulierung der SCF induzierten Proliferation lymphoider Zellen wird in üblicher Weise bestimmt, vorzugsweise über Fluoreszenzmarkierung von Lymphozyten, deren Proliferation mit SCF stimuliert wurde.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen c-kit-Rezeptor durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden und Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, wobei man solche Hybridomzellen kloniert, die Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor produzieren und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor inhibieren und erhältlich sind durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibieren und erhältlich sind durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die SCF induzierte der Proliferation lymphoider Zellen stimulieren und erhältlich sind durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden und Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine stimulierende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung die Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 und DSM ACC 2009.

10

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern gegen c-kit eine Beurteilung der Malignität von Tumoren im Bereich der hämatopoietischen Zellen, von Seminomen sowie von kleinzelligem Lungenkarzinom erreicht werden kann, die wertvolle Hinweise für eine Therapie liefert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Nachweis der Malignität von Tumoren der hämatopoietischen Zellen, von Seminomen und kleinzelligem Lungenkarzinom bei dem man eine Gewebeprobe mit mindestens einem monoklonalen Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor inkubiert und anschließend gebundene Antikörper mittels bekannter Methoden nachweist.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Gewebeprobe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor inkubiert. Vorzugsweise wird dabei ein Antikörper vom IgG-Isotyp verwendet. Es können aber auch Fab oder F(ab')₂ Fragmente verwendet werden.

Zum Nachweis von gebundenem Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor wird beispielsweise mit einem vor oder nach der Bindung an den c-kit-Antikörper markierten zweiten Antikörper gegen murines Fc γ inkubiert. Als Markierung wird üblicherweise ein Enzym, ein Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzfarbstoff verwendet.

Maligne Tumoren der hämatopoietischen Zellen, maligne Seminome sowie bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die in äquivalenter Weise wie die von den Zelllinien DSM ACC 2007, oder DSM ACC 2009 produzierten Antikörper an den c-kit-Rezeptor binden, auch kleinzellige Lungenkarzinome zeigen dabei ein positives Signal.

Eine weitere Verwendung v n ⁴⁴erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibieren, ist die Verwendung zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung einer myeloischen Leukämie.

Die erfindungsgemäßen Zelllinien DSM ACC 2006, DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 und DSM ACC 2009 wurden am 23.05.1991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig hinterlegt.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele in Verbindung mit der Abbildung erläutert.

Figur 1 zeigt die Stimulierung der SCF-induzierten Proliferation lymphoider Zellen durch den monoklonalen Antikörper DSM ACC 2009, sowie die Hemmung der SCF-induzierten Proliferation lymphoider Zellen durch den monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007. Gezeigt wird jeweils der Anteil proliferierender Zellen nach Inkubation von AML-Zellen bei 37°C mit Medium (●), 100 µg/ml SCF (▽), 2 µg/ml der monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007 (▼) bzw. DSM ACC 2009 (Δ), sowie nach Vorinkubation mit den monoklonalen Antikörpern DSM ACC 2007 (□) bzw. DSM ACC 2009 (▲) für 30 Minuten bei 4°C vor der Stimulierung mit SCF.

Beispiel 1

Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor

Das humane c-kit-Gen wird wie von Yarden et. al., (EMBO-Journal, volume 6 (1987), 3341 - 3351) beschrieben, kloniert und in NIH-3T3-Zellen exprimiert. Mit 5.000.000 dieser transfizierten, c-kit-exprimierenden NIH-3T3-Zellen werden Balb/c-

Mäuse intraperitoneal immunisiert. Diese Immunisierung wird in ca. 4-wöchigen Abständen wiederholt. Die Immunisierungsdauer beträgt insgesamt 6 Monate. Anschließend werden die Tiere noch zweimal mit wheat germ agglutinin angereichertem c-kit (s. Beispiel 2) immunisiert, die letzte Immunisierung wird dabei intravenös durchgeführt. Drei Tage nach dieser letzten Immunisierung erfolgt die Immortalisierung von Milzzellen der immunisierten Tiere mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580).

Die Fusion der Milzzellen mit der Myelomzelllinie wird nach dem Standardverfahren gemäß J. of Imm. Meth., 39 (1980), 285 - 308 durchgeführt. Das Fusionsverhältnis Milzzellen:Myelomzellen ist dabei 1:1. Die Fusionsprodukte werden auf 24er Kulturschalen der Firma Greiner mit 5×10^4 Peritonealexsudatzellen der Maus ausgesät. Positive Primärkulturen (Bestimmung gemäß Beispiel 3) werden zwei Wochen nach Fusion mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (Becton Dickinson) kloniert. Die Zellen werden dabei einzeln in 96er Mikrotiterplatten abgelegt und mit HECS-Medium (Tecnoma) gefüttert. Als Kulturmedium wird anschließend handelsübliches RPMI-1640-Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum verwendet.

Zur Gewinnung der monoklonalen Antikörper werden die so erhaltenen Hybridom-Zellklone in vivo expandiert. Dazu werden 5×10^6 Hybridom Zellen intraperitoneal in mit Pristan (Sigma) vorbehandelte Mäuse inokkultiert. Nach 10 - 15 Tagen werden je Maus 2 - 3 ml Ascites entnommen und daraus der monoklonale Antikörper nach herkömmlichen Methoden gewonnen. Die Ausbeute beträgt etwa 5 mg IgG/ml Ascites.

Beispiel 2

43

Anreicherung des c-kit-Rezeptor-Proteins über wheat germ agglutinin Agarose

Die c-kit exprimierende transfizierte NIH-3T3 Zelllinie c-kit wird in DMEM/F12 (1:1) Medium, das 10 % FKS und 2 mmol/l Glutamin enthält, bis zur Konfluenz in Rollerflaschen kultiviert. Anschließend werden die Zellen in 20 ml Lysepuffer lysiert. Der Lysepuffer enthält 50 mmol/l Hepes pH 7,5; 150 mmol/l Natriumchlorid; 1,5 mmol/l $MgCl_2$; 1 mmol/l EGTA; 1 % Triton X-100; 10 % Glycerin und 4 $\mu g/ml$ PMSF. Das Lysat wird 1 Stunde bei 100.000 g zentrifugiert, der Überstand 1:1 mit Her2x-Puffer verdünnt und über Nacht bei 40°C im Batch-Verfahren an wheat germ agglutinin-Agarose (Sigma) gebunden (Her2x-Puffer: 50 mmol/l Hepes pH 7,2; 150 mmol/l Natriumchlorid; 1 % Triton X-100; 10 % Glycerin und 4 $\mu g/ml$ PMSF). Anschließend wird die wheat germ agglutinin-Agarose mit 10 Volumen Her2x-Puffer gewaschen und schließlich c-kit-Rezeptor-Protein mit 0,3 mol/l N-Acetyl-glucosamin in Her2x-Puffer eluiert.

Beispiel 3

Bestimmung der Spezifität der produzierten Antikörper

Um die Spezifität der Antikörper im Kulturüberstand der Hybridomzellen zu erfassen, wird ein Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA) angewendet.

Dazu werden 96er Mikrotiterplatten (Nunc) mit 100 μl c-kit-Antigen (Isolierung nach Beispiel 2; 5 $\mu g/ml$ in Carbonatpuffer, Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 726559) beschichtet, mit 100 μl Kulturüberstand (1:25 mit PBS (nach Dulbecco und Vogt, J.Exp.Med. 99 (1954), 167 - 182) verdünnt) 2 Stunden

14

bei Raumtemperatur inkubiert und mit 3 x 350 µl PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Danach wird mit POD markiertem Schaf-Anti-Maus IgG (10 mU; Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 1317377) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3 x 350 µl PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und die Nachweisreaktion mit 100 µl ABTS® (1 mg/ml, Boehringer Mannheim Katalog Nr. 756 407) in 40 mmol/l Citrat-Puffer pH 4,4, der 3,25 mmol/l Natriumperborat enthält (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 1204 530) ausgelöst. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Extinktionen in einem Photometer bei 405 nm bestimmt.

Beispiel 4

Bestimmung der Wirkung der produzierten Antikörper auf die SCF induzierte Proliferation lymphoider Zellen und die Bindung von Wachstumsfaktoren

Lymphozyten werden durch Dichtegradientenzentrifugation (Lymphozyten-Trennmedium Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 295 949) isoliert und in RPMI 1640 komplett (10 % fötales Kälberserum, 2 mmol/l Glutamin, 1 % Vitaminlösung (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 210 307), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) auf einen Zelltitert von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension werden zusammen mit 10 µl rekombinantem menschlichen SCF (Amgen Thousand Oaks USA; Endkonzentration 100 ng/ml), sowie in Parallelansätzen mit 2 µg/ml des zu untersuchenden monoklonalen Antikörpers für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In zwei weiteren Parallelansätzen wird zunächst mit 2 µg/ml des zu untersuchenden monoklonalen Antikörpers für 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert und anschließend 100 ng/ml SCF zugesetzt. Anschließend werden diejenigen Zellen, die einen zu untersuchenden monoklonalen Antikörper gebunden haben, durch Fluoreszenzmarkierung mit FITC gekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin aus dem Schaf angefärbt (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 821 462), sowie die DNA dieser Zellen durch Behandlung

15

der Zellen mit einer hypotonen Lösung von 0,05 mg/ml Propidiumjodid (Sigma) und 0,1 % Natriumcitrat angefärbt und die Markierungen in einem FACS IV Zellsorter (Becton Dickinson) untersucht. Die Anregung erfolgt bei 488 nm, die Messung der FITC-markierten Zellen bei 530 nm, und die der Propidiumjodid-markierten Kerne bei 610 nm. Der prozentuale Anteil von proliferierenden Zellen ergibt sich aus der Summe der mit Propidiumjodid-markierten Anteile von Zellen, die sich in der S-Phase, sowie in der G2- bzw. M-Phase befinden (%S + %G2/M). Die Figur 1 zeigt den stimulierenden Effekt des monoklonalen Antikörpers DSM ACC 2009 auf die SCF-induzierte Proliferation lymphoider Zellen, sowie den hemmenden Effekt des monoklonalen Antikörpers DSM ACC 2007 auf die SCF-induzierte Proliferation lymphoider Zellen.

Der monoklonale Antikörper DSM ACC 2007 bewirkt zusätzlich eine Hemmung der Bindung von SCF an den c-kit-Rezeptor. Zum Nachweis dieser Wirkung werden die wie oben beschriebenen isolierten Lymphozyten 30 Minuten auf Eis in PBS mit 0,01 % NaN₃ und 2 µg/ml des monoklonalen Antikörpers DSM ACC 2007 inkubiert. Anschließend werden 125 ng/ml biotinylierter SCF zugegeben und die Zellen mit Streptavidin-Phycoerythrin (Dianova) gefärbt. Die Auswertung erfolgt in einem FACS IV Zellsorter (Becton Dickinson) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Messung bei 570 nm. Im Vergleich zu einem Kontrollsatz ohne Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007 ergibt sich eine 98 %-ige Hemmung der SCF-Bindung an Lymphozyten durch den monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007.

Medium (RPMI 1640 komplett)

440 ml RPMI 1640 (Boehringer Mannheim BM 209 945)

50 ml fötales Kälberserum (FKS) (BM 210 471)

5 ml Glutaminlösung, 200 mmol/l (BM 210 277)

5 ml Vitaminlösung (1 %) (BM 210 307)

1 ml Penicillin (50 000 IU) und Streptomycin (50 mg)

Vitaminlösung (BM 210 307): ¹⁶

	mg/100 ml		mg/100 ml
Ca-D(+)-Pantothenat	10,0	Nicotinsäure-	10,0
		amid	
Cholinchlorid	10,0	Pyridoxal . HCl	10,0
Folsäure	10,0	Riboflavin	1,0
meso-Inosit	20,0	Thiamin . HCl	10,0

Beispiel 5

Bestimmung der Epitopüberlappung von Antikörpern gegen c-kit

Zum Nachweis der Epitopüberlappung eines Antikörpers mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007 wird ein kompetitiver Enzym-Immunoassay durchgeführt. Dazu wird das nach Beispiel 2 angereicherte c-kit-Rezeptor Protein zunächst mit D-Biotinyl- ϵ -amidocaponsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1008960) gemäß Angaben des Herstellers biotinyliert. Von diesem biotinylierten Antigen werden 300 ng in einem Volumen von 100 μ l PBS durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Herstellung nach EP-A 0 344 578) gebunden. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird 90 Minuten bei Raumtemperatur simultan inkubiert mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007, der mit Peroxidase markiert wurde (Endkonzentration 250 mU/ml) und dem zu beurteilenden Antikörper. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird mit der Enzymsubstratlösung ABTS® in Natriumperborat enthaltendem Puffer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 405 nm als Maß

17

für die Menge des gebundenen, POD markiert n, monoklonalen Antikörpers DSM ACC 2007 gemessen. Dieser Wert wurde verglichen mit der Extinktion, die erhalten wurde, bei Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007 allein. Wenn bis zu einem 10^5 -fachen Überschuß an zu beurteilendem Antikörper gegenüber dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2007 Enzymkonjugat (250 mU/ml) mindestens 50 % Kompetition zu erkennen sind, liegt eine Epitopüberlappung vor.

Beispiel 6

Bestimmung der Expression des c-kit-Rezeptor Proteins in verschiedenen Geweben und Tumoren

Der zu untersuchende Gewebeschnitt wird 2 Stunden bei 4°C mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-kit (DSM ACC 2007, DSM ACC 2009 bzw. DSM ACC 2008, jeweils 20 µg/ml) inkubiert. Nach einem Waschschrift (3 x 5 Minuten in PBS/0,05% Tween-20) wird der Gewebeschnitt mit Schaf-Anti-Maus IgG (100 µg/ml, Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 1092618) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundener Antikörper wird über einen Komplex aus Peroxidase und murinem Anti-Peroxidase-Antikörper (250 mU/ml, Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 1092 626, 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur) nachgewiesen. Die Nachweisreaktion wird mit Diaminobenzidin (1 mg/ml) ausgelöst und an einem Mikroskop ausgewertet.

Die folgende Tabelle zeigt die nach dieser Methode bestimmte Reaktivität der aus den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 und DSM ACC 2009 erhaltenen monoklonalen Antikörper.

18
monoklonal Antikörper

Gewebe	DSM ACC 2007	DSM ACC 2008	DSM ACC 2009
Seminom	+	+	+
kleinzelliges Lungenkarzinom	+	-	+
gesundes Lungengewebe	-	-	-

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, erhältlich aus den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 oder DSM ACC 2009 oder in äquivalenter Weise an den c-kit-Rezeptor bindefähig wie die von den Zelllinien DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 oder DSM ACC 2009 produzierten Antikörper.
2. Monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor inhibiert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.
3. Monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibiert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden,

Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.

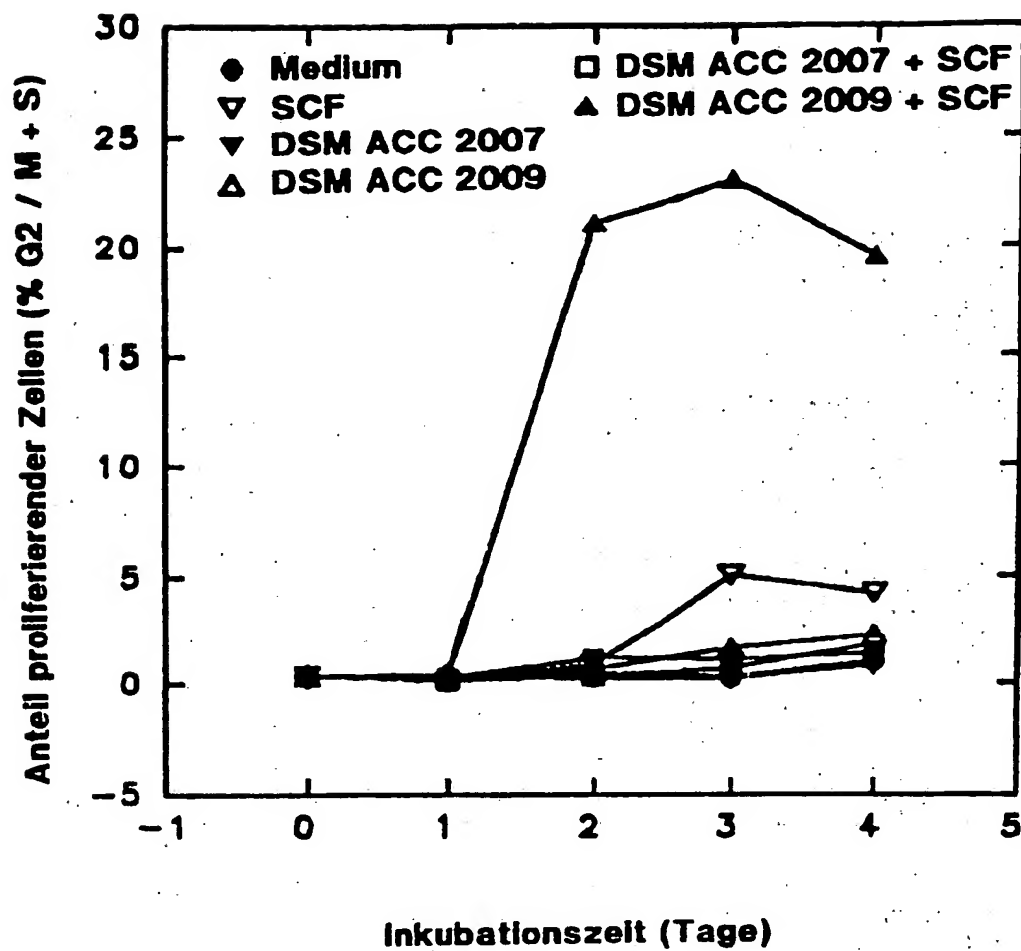
4. Monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welcher die SCF-induzierte Proliferation lymphoider Zellen stimuliert und erhältlich ist durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen, Klonierung der auf diese Weise identifizierten gewünschten Hybridomzellen und Isolierung des von diesen Klonen produzierten Antikörpers nach bekannten Verfahren.

5. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung von solchen Hybridomzellen, die Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor produzieren und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man solche Hybridomzellen kloniert, deren Kulturüberstand solche Antikörper enthält, die mit dem Paraffin-behandelten c-kit-R zeptor reagieren und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.
7. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor inhibieren durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Bindung von Wachstumsfaktoren an den c-kit-Rezeptor, Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturüberstand dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.
8. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die Stimulierung der Proliferation lymphoider Zellen durch SCF inhibieren durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die Proliferation lymphoider Zellen,

Identifizierung solcher Hybridomzellen, deren Kulturbedingung dabei eine hemmende Wirkung aufweist, Klonierung dieser Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

9. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor, welche die SCF-induzierte Proliferation lymphoider Zellen stimulieren durch Immunisierung mit Säugerzellen, die mit einer in diesen Zellen exprimierbaren c-kit-Sequenz transfiziert wurden, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Identifizierung derjenigen Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, über die Bestimmung der Bindung des erhaltenen Antikörpers an den c-kit-Rezeptor, sowie die Bestimmung der Wirkung dieses Antikörpers auf die SCF induzierte Proliferation lymphoider Zellen, Klonierung der auf diese Weise identifizierten gewünschten Hybridomzellen und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörpern nach bekannten Verfahren.
10. Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper gegen den humanen c-kit-Rezeptor produziert, ausgewählt aus der Gruppe DSM ACC 2007, DSM ACC 2008 und DSM ACC 2009.
11. Verfahren zum Nachweis der Malignität von Tumoren der hämatopoietischen Zellen, von Seminomen oder kleinzelligem Lungenkarzinom, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Gewebeprobe mit mindestens einem monoklonalen Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor inkubiert und anschließend gebundene Antikörper mittels bekannter Methoden nachweist.

1/1
Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/01117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.: ⁵ C12P21/08; C12N5/20; G01N33/574; G01N33/577
 //C12N15/06; C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) r to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.: ⁵ C07K; C12P; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBO JOURNAL Vol. 6, No. 11, November 1987, OXFORD, GB pages 3341 - 3351; Y.YARDEN ET AL.: "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." cited in the application see the whole document	1-11
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY Vol. SUP 0, No. 15F, 1991, NEW YORK, USA page 89; L. ASHMAN: "A murine monoclonal antibody to the human c-kit proto-oncogene product SCF receptor effect on the growth of hemopoietic urogenitor cells in-vitro and expression of	1-3, 5-8, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 20 August 1992 (20.08.92)

Date of mailing of the international search report

01 September 1992 (01.09.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/01117

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	c-kit in AML." see abstract -----	
X	WO,A,8 901 973 (APPLIED BIOTECHNOLOGY, INC. & WHITEHEAD INST. FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 9 March 1989 see claims 5,10,19,24,25,30 -----	1-11
A	LEUKEMIA RESEARCH Vol. 14, No. 7, 1990, pages 637 - 644; L. ASHMAN ET AL.: "A monoclonal antibody that inhibits the action of GM-CSF on normal but not leukaemic progenitors." see the whole document -----	1-3,5-8-11
P,X	CLINICAL RESEARCH Vol. 39, No. 2, 1991, page 210A; V. BROUDY ET AL.: "Isolation and characteri- zation of a monoclonal antibody SR-1 that recognizes the stem cell factor receptor c-kit." see abstract -----	1-3,5-8

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9201117
SA 59460

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 20/08/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8901973	09-03-89	None	

EP 0 FORM P003

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12P21/08; C12N5/20; G01N33/574; G01N33/577
//C12N15/06C12N15/12**II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE**Recherchierte Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem

Klassifikationssymbole

Int.Kl. 5

C07K ;

C12P ;

C12N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸**III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹**

Art ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	EMBO JOURNAL Bd. 6, Nr. 11, November 1987, OXFORD, GB Seiten 3341 - 3351; Y. YARDEN ET AL.: 'Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.' In der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY Bd. SUP 0, Nr. 15F, 1991, NEW YORK, USA Seite 89; L. ASHMAN: 'A murine monoclonal antibody to the human c-kit proto-oncogene product SCF receptor effect on the growth of hemopoietic Urogenitor cells in-vitro and expression of c-kit in AML.' siehe Zusammenfassung ---	1-3, 5-8, 11

⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. AUGUST 1992

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01. 09. 92

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

NOOIJ F.J.M.

III. EINECHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	WO,A,8 901 973 (APPLIED BIOTECHNOLOGY, INC. & WHITEHEAD INST. FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 9. März 1989 siehe Ansprüche 5,10,19,24,25,30 ---	1-11
A	LEUKEMIA RESEARCH Bd. 14, Nr. 7, 1990, Seiten 637 - 644; L. ASHMAN ET AL.: 'A monoclonal antibody that inhibits the action of GM-CSF on normal but not leukaemic progenitors.' siehe das ganze Dokument ---	1-3,5-8, 11
P,X	CLINICAL RESEARCH Bd. 39, Nr. 2, 1991, Seite 210A; V. BROUDY ET AL.: 'Isolation and characterization of a monoclonal antibody SR-1 that recognizes the stem cell factor receptor c-kit.' siehe Zusammenfassung ---	1-3,5-8

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9201117
SA 59460

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

20/08/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8901973	09-03-89	Keine	

EPO FORM P013

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

